

УДК: 633.11.111:631.147

С.С.БЕККУЖИНА, *Е.З. КОЧИЕВА

АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ДИГАПЛОИДНОЙ ЛИНИИ И ГАМЕТОКЛОНАЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM L.*)

(Представлена академиком НАН РК И.Рахимбаевым)

В результате молекулярного анализа для дигаплоидной линии пшеницы, исходной формы и гаметоклонов получены образец-специфические RAPD-спектры, охарактеризованы уровни геномного полиморфизма, определены генетические расстояния между анализируемыми линиями.

В настоящее время дигаплоидные линии успешно используются в селекционном процессе для создания новых сортов овощных (перец, огурец, картофель), фруктовых (яблоня, земляника, виноград) и особенно зерновых культур (рис, ячмень, кукуруза, пшеница, сорго, овес и др.) [1-4]. Однако следует отметить, что при крайней привлекательности сама методика получения гаплоидных, а затем и дигаплоидных линий сопряжена с некоторыми трудностями теоретического и методологического характера. Наиболее успешно, особенно для злаков, применяется методика культивирования пыльников.

Дигаплодные линии, кроме использования их для решения селекционных задач, успешно применяются для идентификации новых генов и локусов, а также для карттирования геномов, локусов количественных признаков и отдельных генов [4-8]. Анализ растений-регенерантов, полученных из культивируемых гамет, выявил вариабельность их геномов, которая была названа гаметоклональной вариабельностью [9].

Для анализа изменений в геномах дигаплоидных линий используются различные молекулярные методы, в том числе и RAPD -метод (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA), основанный на анализе полиморфизма длин фрагментов ДНК, амплифицируемых с помощью случайных праймеров [10, 11].

В данной работе RAPD маркирование использовали для анализа полиморфизма генома дигаплоидной солеустойчивой линии, полученной в культуре пыльников пшеницы, а также гамето-

клональных вариантов, отобранных во втором цикле селекции на уровне гамет.

Для проведения молекулярного анализа использовали сорт яровой мягкой пшеницы Целинная – Юбилейная, как исходную форму дигаплоидной солеустойчивой линии Ю580-R, полученной в культуре пыльников, а также анализировали гаметоклональные варианты ЛГВ3-692-3-5, ЛГВ20/92-2, ЛГВ1-192-2, индуцированные в культуре пыльников из солеустойчивой линии Ю580R [12]. Сорт Акмола -2 выбран в качестве внешней группы при оценке уровня генетической вариабельности дигаплоида и гаметоклональных вариантов.

Выделение ДНК и RAPD-анализ проводили по ранее отработанной методике (Кочиева и др., 1999) [13]. Всего для выявления полиморфизма между анализируемыми образцами ДНК линий пшеницы использовано 19 RAPD праймеров. Все эксперименты проводились в трёх повторностях.

В статистический анализ включены только четкие, воспроизводимые фрагменты. По каждому из наборов данных составлены бинарные матрицы (1/0). На основании матриц с использованием формулы Жаккарда рассчитаны коэффициенты попарных генетических различий между образцами: $J_{ij} = a/(a+b+c)$, где a – число одинаковых фрагментов спектров образцов i и j , b – число фрагментов, представленных в спектре образца i , c – число фрагментов, представленных в спектре образца j [14]. На основе полученных матриц с помощью метода иерархического кла-

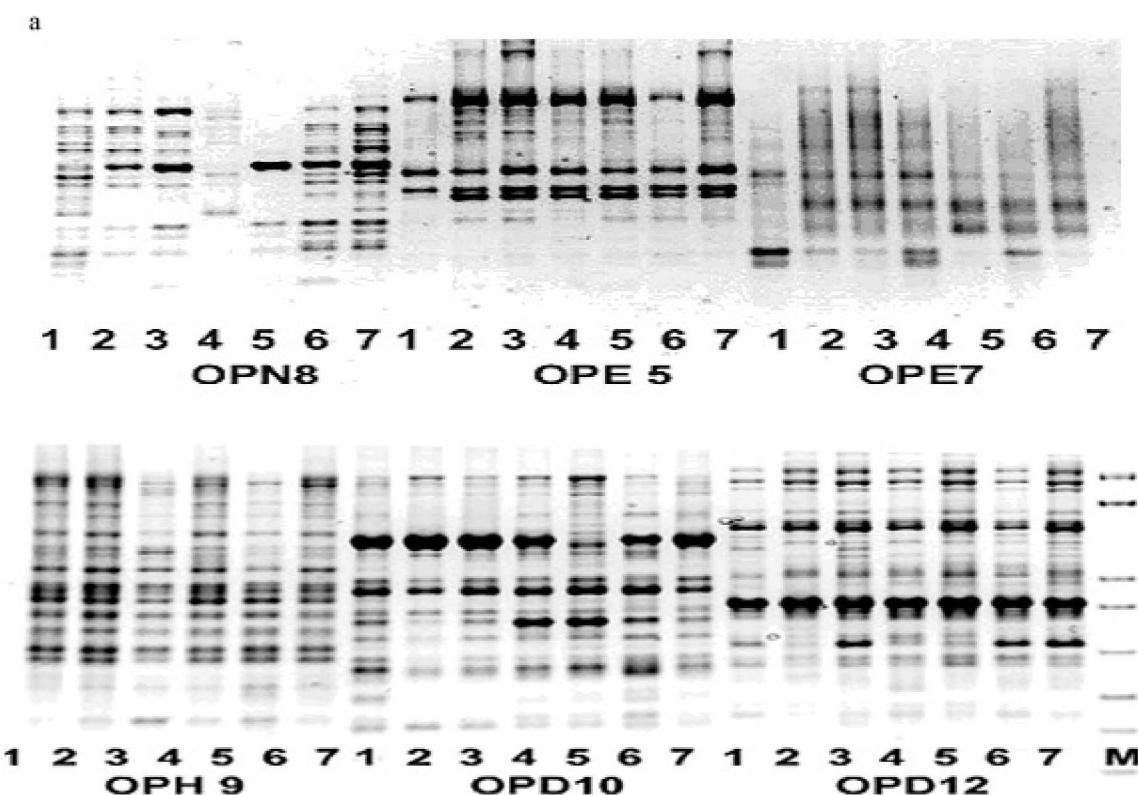


Рис.1. RAPD-спектры сортов и гаплоидных линий яровой мягкой пшеницы:

а) полученные при использовании праймеров OPN8, OPE5 и OPE7;

б) полученные при использовании праймеров OPH9, OPD10, OPD12;

дорожки: 1- Акмола 2 ; 2-Ю580R; 3- Целинная –Юбилейная; 4- ЛГВ-1/92-2; 5- ЛГВ-20/92-2; 6- ЛГВ-6/92-3-5; M- маркер длины фрагментов 1kb DNA ladder (“Gibco BRL”)

стерного анализа (UPGMA) построена дендрограмма (пакет программ TREECON) [15].

Анализ полученных результатов показал, что при сравнении RAPD-спектров исследуемых образцов ДНК сортов и линий пшеницы наибольшим количеством уникальных фрагментов, как и ожидалось, отличался образец Акмола 2 (рис. 1, а, б). Наиболее похожие спектры амплифицировались у образцов Целинная–Юбилейная и Ю580R. В последнем случае различия наблюдались только в амплификации 4 фрагментов (например, 340 нп_{OPD12} 420 нп_{OPD10}). Спектры гаметоклонов ЛГВ-6/92-3-5, Л ГВ-1/92-2, ЛГВ-20/92-2 также характеризовались присутствием специфических RAPD-фрагментов. При этом в большинстве RAPD – спектров всех анализируемых линий пшеницы выявляются общие фрагменты: как отдельные мажорные полосы, так и блоки из нескольких (3-9) фрагментов (рис.1). Тем не менее, в результате проведенного RAPD-маркирования каждый из полученных спектров анализи-

руемых гаметоклонов характеризуется уникальным набором амплифицированных фрагментов. При сравнении спектров между собой исходной солеустойчивой дигаплоидной линии Ю580-R и полученных из нее гаметоклонов ЛГВ-6/92-3-5, ЛГВ-20/92-2, ЛГВ-1/92-2 выявлено 13 полиморфных фрагментов.

Генетическое сходство между всеми анализируемыми образцами достаточно велико, и рассчитанные генетические расстояния не превышали 0,16. Наименьшие геномные различия (0,02) наблюдались между сортом Целинная –Юбилейная и полученной из нее дигаплоидной линией Ю-580 R.. Это служит молекулярно-генетическим доказательством эффективного использования андрогенеза *in vitro* для ускоренного создания гомозиготных линий.

Величины генетических расстояний использовались для построения дендрограммы, отражающей родство геномов анализируемых линий (рис.2).

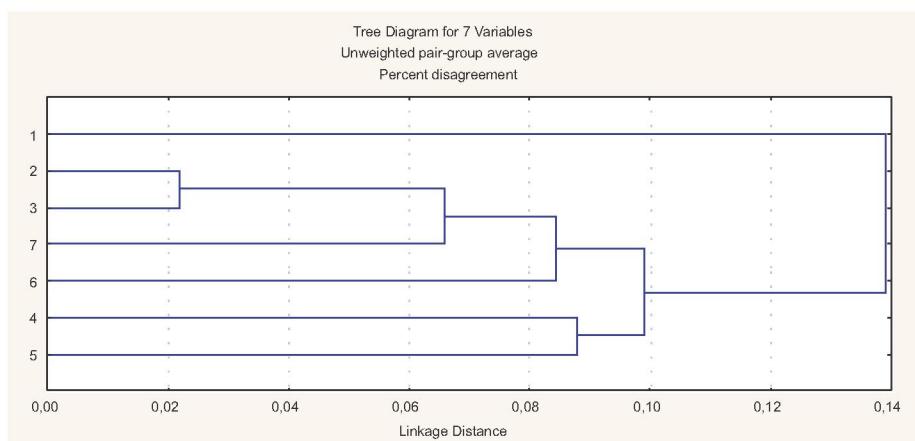


Рис.2. Дендрограмма, отражающая генетические различия между образцами исходных сортов и дигаплоидных линий пшеницы: 1- Акмола-2; 2- Ю580R; 3- Целинная –Юбилейная; 4- Л ГВ-1/92-2; 5- Л ГВ-20/92-2; 6 Л ГВ-6/92-3-5

Отдельную, наиболее генетически отдаленную, ветвь образует сорт Акмола-2. Все остальные линии образуют один кластер с исходным сортом Целинная-Юбилейная. Этот кластер подразделяется по степени сходства геномов анализируемых образцов на два подкластера. Первый составляют гаметоклональные линии ЛГВ-1/92-2 и ЛГВ-20/92-2. Эти две линии значительно отличаются от остальных, и при этом геномные различия между ними существенны, что подтверждается как высотой точки ветвления, так и данными по определению генетических расстояний (0,09). Интересно то, что третий гаметоклон ЛГВ-6/92-3-5 попадает в другой подкластер вместе с исходным сортом Целинная-Юбилейная и солеустойчивой дигаплоидной линией Ю-580 R. Различия между гаметоклонами ЛГВ-1/92-2, ЛГВ-6/92-3-5 и ЛГВ-20/92-2 больше, чем между исходным сортом Целинная-Юбилейная и Ю-580 R. Этот факт можно скорее всего объяснить происхождением линий и результатами вторичного цикла селекции на уровне гамет.

В результате проведенного молекулярного анализа для всех дигаплоидных линий и исходных форм получены образец-специфические RAPD-спектры, охарактеризованы уровни геномного полиморфизма, определены генетические расстояния между анализируемыми линиями. Проведенное молекулярное маркирование показало, что линии, отобранные с помощью селекции на уровне гамет: солеустойчивая-Ю580R, а

также гаметоклоны, отличаются уникальным набором амплифицированных фрагментов. Это однозначно свидетельствует о том, что селекцию на уровне гамет можно использовать для создания уникальных гаметоклональных вариантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Jain, S.K. Sopory, R.E. Veilleux (eds) Kluwer Acad Press. *In vitro Haploid production in higher plants*, 1996, vol.2, pp.1-429.
 2. Xu L., U. Najeeb, G.X. Tang, et al. Haploid and Doubled Haploid Technology // *Advances in Botanical Research*, 2007 Vol. 45, P 181-216.
 3. Gemes Juhasz, A., Venczel, G., Sagi et al. Production Of Doubled Haploid Breeding Lines In Case Of Paprika, Spice Paprika, Eggplant, Cucumber, Zucchini And Onion // *Acta Hort.*, 2006, 725:845-854.
 4. T. Tenhola-Roininen, S. Immonen and P. Tanhuampaa. Rye doubled haploids as a research and breeding tool – a practical point of view // *Plant Breeding*, 2006 125:6, 584–590
 5. Chen, Y. Kenaschuk & P. Dribbenki Inheritance of rust resistance genes and molecular markers in microspore-derived populations of flax // *Plant Breeding*, 2001 120(1) 82-84
 6. L. Cistue, B. Echavarri, F. Batlle et al. // I. Romagosa , 2005.
 7. Semagn K, Bjornstad A Skinnes H et al. Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population // *Genome*, 2006 Vol. 49, pp. 545-555.
 8. Xu Yang, Yang-Jun Yu, Feng-Lan Zhang et al. Map Construction and Quantitative Trait Loci Analysis for Bolting Based on a Double Haploid Population of *Brassica rapa* // *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007 49 (5), 664–671.
 9. Morrison, R.A. and Evans, D.A. Gametoclonal variation // In: *Plant Breeding Reviews*, 1987. Volume 5. p. 359?391 Janick, J. (Ed.). AVI Press, Westport, Conn.

10. Bueno A., Agundez M.D., A. Gomez, et al Haplod Origin of Cork Oak Anther Embryos Detected by Enzyme and RAPD Gene Markers// International Journal of Plant Sciences, 2000 Vol. 161, No.3 , pp. 363-367.

11. Bocianowski J, J Cheikowski, A Kuczyska et al Assessment of RAPD markers for barley doubled haploid lines resistant and susceptible to Fusarium culmorum at seedling and adult plant growth stages // Appl Genet., 2003, 44 (3), 355-60.

12. Беккужина С.С. Использование DH-метода для проведения гаметной селекции // 7-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых, М., 2003г //Сборник тезисов. С. 90.

13. Коциева Е.З., Супрунова Т.П., Семенова С.К. Идентификация меж- и внутрисортового полиморфизма у томатов // Генетика. 1999. Т.35. № 10. С.1386–1389.

14. Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. *Numerical Taxonomy—the Principles and Practice of Numerical Classification*, San Francisco: Freeman, 1973.

15. Van de Peer, Y. and De Wachter, R., TREECON for Windows: A Software Package for the Construction and Drawing of Evolutionary Trees for the Microsoft Windows Environment // Comput. Appl. Biosci., 1994, vol. 10, pp. 569–570.

Резюме

Жаздық жұмысқа бидай линияларының арасындағы айырмашылықтар RAPD-талдау әдісімен зерттелді. Талданған бидай линияларының полиморфизмін анықтауға 19 праймер қолданылды. Алынған ДНК спектрлерінде көбейген ДНК үзінділерінің саны мен көлемі әр түрлі болды. Гамета деңгейінде сұрыпталған Ю580R ли-

ниясы және одан алынған гаметоклондардың амплификацияланған ДНК фрагменттері ерекше, яғни гамета селекциясы арқылы пайдалы гаметоклондар алынды деп тұжырымдауга болады.

Summary

The method of molecular RAPD-marking was used to analyse polymorphism of genomes of dihaploid salt resistant wheat line, U580R, and its original form, Tselinnaya-Jubileinaya, as well as gametoclinal anther-derived variations, selected from U580R line. As a result of molecular analysis, sample-specific RAPD specters were obtained for all lines and original forms. Based on the genetic distances, a tree diagram reflecting linkages of genomes of the analyzed lines was designed.

All the other lines, including the salt resistant dihaploid one and the gametoclinal lines based on that one, constitute one cluster together with the original variety Tselinnaya-Jubileinaya, whose anther culture was used for their derivation. Based on the extent of similarity of the genomes of the samples analysed, this cluster can be divided into two subclusters.

The molecular marking has indicated that the lines bred through gamete level selection, such as the salt resistant U580R line, as well as gametoclones, are characterized by unique sets of amplified fragments. It definitely means that gamete level selection can be used for development of unique gametoclinal variations.

Казахский агротехнический университет
им. С. Сейфуллина;

*РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева Поступила 21.12.2009 г.